

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 50 247.1

**Anmeldetag:** 28. Oktober 2002

**Anmelder/Inhaber:** Leica Microsystems Heidelberg GmbH,  
Mannheim/DE

**Bezeichnung:** Probenträger für die Mikroskopie und Verfahren  
zum Anfertigen eines Probenträgers

**IPC:** G 02 B 21/34

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. Juli 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ebert".

**Ebert**

**Probenträger für die Mikroskopie und Verfahren zum Anfertigen eines  
Probenträgers**

Die Erfindung betrifft einen Probenträger für die Mikroskopie, insbesondere die konfokale Mikroskopie. Speziell betrifft die Erfindung einen Probenträger

5 für die Mikroskopie aus einem ersten Deckglas und einem zweiten Deckglas.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Anfertigen eines Probenträgers, insbesondere für die konfokale -Mikroskopie.

Die deutsche Patentanmeldung DE 101 00 247 beschreibt ein Mikroskop, das mit zwei Objektiven versehen ist, um einen Objektträger von beiden Seiten zu untersuchen und somit eine Auflösungsverbesserung zu erzielen. Dazu

10 besteht der Objektträger aus zwei Deckgläsern, die einen Zwischenraum für die zu untersuchende Probe definieren. Eines der Deckgläser trägt eine optisch detektierbare Schicht, die somit das Fokussieren erleichtert. Nachteil bei diesem Probenträger ist, dass die optisch detektierbare Schicht sich auch

15 über die zu untersuchende Probe erstreckt. Dies beeinflusst zweifellos die Detektierbarkeit der Probe.

Bisher werden Objektdeckgläser benutzt, bei denen eine Hälfte des Probenraums halbmondartig verspiegelt ist. Eine andere Methode besteht darin, kleine Spiegelplättchen verteilt in die Probe einzubringen.

20 Nachteilig in der bisherigen konfokalen Mikroskopie ist die Entnahme von Justagemitteln aus der Fokalebene, die eine nachfolgende Betrachtung von Proben mit dem eben vorjustiertem Mikroskop erschwert, bzw. unsicher macht. Der optische Aufbau eines Mikroskops muss gerade durch die Entnahme der Justagemittel verändert werden.

Die halbseitig verspiegelten Deckgläser haben den Nachteil, dass der Anwender häufig Schwierigkeiten hat, die verspiegelte Fläche zu finden. Außerdem ist der Probenbereich so groß, dass die Probe häufig nicht gut lokalisiert werden kann. Die Methode mit den Spiegelplättchen ist nicht geeignet, da die Plättchen schwer zu finden sind und auch zerstöranfällig sind.

5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde einen Probenträger für die Mikroskopie, insbesondere die konfokale Mikroskopie, zu schaffen, der zusätzlich zur Untersuchung der Probe, auch eine Justage des Mikroskops ermöglicht.

10  Diese Aufgabe wird gelöst durch einen Probenträger mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

15 Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren zu schaffen, mit dem ein Probenträger zur Untersuchung einer Probe präpariert und zusammengestellt wird, wobei der Probenträger Justagehilfsmittel enthält, die nicht die zu untersuchende Probe stören.

20  Die obige Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, das die Merkmale des Teils des Anspruchs 14 umfasst.

25 Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn der Probenträger derart gestaltet ist, dass er nicht mit Justagemitteln die zu untersuchende Probe stört. Der erfindungsgemäße Probenträger ist insbesondere für die konfokale Mikroskopie geeignet. Dazu umfasst er ein erstes Deckglas und eine zweites Deckglas. Eines der Deckgläser trägt einen Randspiegel, der derart ausgestattet ist, dass er einen Probenbereich umschließt. Das erste und das zweite Deckglas sind derart zusammengefügt, dass sie in einem dadurch gebildeten Zwischenraum die zu untersuchende Probe einschließen. Der auf dem Deckglas angeordnete Randspiegel weist auf den Zwischenraum hin.

30 Ferner ist ein Rahmen vorgesehen ist, der das erste und das zweite Deckglas hält. In diesem Zwischenraum ist ein Medium gefüllt, das in etwa den gleichen Brechungsindex wie das erste und das zweite Deckglas aufweist.

35 Das Substrat des ersten und des zweiten Deckglases kann aus anisotropen oder isotropen und für die verwendeten Wellenlängen transparenten

Materialien bestehen. Der Randspiegel ist aus einem Material aufgebaut, das für einen Wellenlängenbereich zwischen  $\lambda = 300\text{nm} - 1300\text{nm}$  reflektierend ist. Ist das Material des Randspiegels Aluminium oder Silber, so ist dieses mit einer Schutzschicht versehen. Ferner kann das Material des Randspiegels

5 aus Gold alleine bestehen. Hinzu kommt, dass auch das Gold des Randspiegels mit einer Schutzschicht versehen sein kann. Ebenso kann anstatt der Gold-, Silber- oder Aluminiumverspiegelung eine dielektrische Verspiegelung vorgesehen sein. Es ist selbstverständlich, dass der Randspiegel eine beliebige Form annehmen kann. Besonders bevorzugt ist  
10 eine symmetrische Form des Randspiegels, wobei am einfachsten der Randspiegel als Ring ausgebildet ist.

Es ist besonders vorteilhaft, wenn die verwendeten Deckgläser symmetrisch ausgestaltet sind. An einfachsten für das Anbringen eines Rahmens haben sich runde Deckgläser erwiesen.

15 Das Verfahren zum Anfertigen eines Probenträgers, insbesondere für die konfokale Mikroskopie, ist ebenfalls von besonderen Vorteil, da dieses eine sichere Probenpräparation gewährleistet. Zunächst erfolgt das Aufbringen einer wässrigen Lösung, die zumindest die Probe oder mehrere Probenteile enthält. Die wässrige Lösung wird auf einen Probenbereich eines zweiten  
20 Deckglases des Probenträgers aufgebracht. Der Probenbereich ist durch den inneren Bereich des z.B. ringförmigen Randspiegels definiert. Anschließend erfolgt das Trocknen des zweiten Deckglases, so dass das Wasser verdunstet und die Probe am Probenbereich des zweiten Deckglases des Probenträgers haften bleibt. Ist die Probe bzw. das Deckglas getrocknet, erfolgt das  
25 Aufbringen eines Mediums auf die Probe, das im Wesentlichen dem Brechungsindex des verwendeten Deckglases entspricht. Dann erfolgt das Zusammenfügen eines ersten Deckglases und des zweiten Deckglases derart, dass sich die Probe in einem durch das erste und das zweite Deckglas gebildeten Zwischenraum befindet. Letztlich wird das zusammengefügte erste  
30 und zweite Deckglas in einen Rahmen eingebracht.

Das erste oder das zweite Deckglas wird am Rahmen mit einem Spezialkleber fixiert. An gegenüberliegenden Seiten des Probenträgers ist jeweils ein

Objektiv derart angeordnet, dass dessen optische Achse durch den Probenbereich verläuft, und dass jedes Objektiv über ein Immersionsmedium an das erste und das zweite Deckglas an den Probenträger optisch gekoppelt wird. Ein ringförmiger Spiegel ist für Justagezwecke besonders vorteilhaft, da

5 beim Verfahren des Probenträger bzw. der optischen Achse der Weg vom Zentrum des Probenträger zum verspiegelten Rand hin annähernd gleich groß ist. Die Symmetrie des verspiegelten ringförmigen Bereichs erlaubt somit, dass unabhängig von dem Verfahrweg des Tisches immer nach einer gewissen Wegstrecke dieser verspiegelte Bereich gefunden wird. Der

10 Randspiegel wird in einer ganz besonders vorteilhaften Ausführung zu Justagezwecken eines interferometrischen Aufbaus, wie z.B. eines 4Pi-Mikroskops, verwendet. So werden durch Wellenfrontenvergleich zweier Wellenfronten, die jeweils von einer der sich gegenüberliegenden Seite des Randspiegels reflektiert werden, deren Phasenbeziehungen verglichen. So

15 kann durch den Abgleich eine optimale Einstellung des interferometrischen Aufbaus vorgenommen werden. Weiterhin kann der Randspiegel zum Weglängenabgleich in einem interferometrischen Aufbau, insbesondere im 4Pi-Mikroskop, verwendet werden.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und

20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines 4Pi-Mikroskops,

Fig. 2 eine schematische Darstellung eines Teils des optischen Strahlengangs des 4Pi-Mikroskops aus Fig. 1,

25 Fig. 3 eine Seitenansicht eines Probenträgers für die konfokale Floureszenzmikroskopie,

Fig. 4a eine Draufsicht auf ein kreisförmiges Deckglas,

Fig. 4b eine Seitenansicht des Deckglases aus Fig. 4a,

Fig. 5a eine Draufsicht auf ein kreisförmiges Deckglas mit einem Randspiegel;

30 Fig. 5b eine Seitenansicht des Deckglases aus Fig. 5a,

Fig. 6 eine Draufsicht auf eine weitere Ausführungsform des

Deckglasses mit dem Randspiegel;

Fig. 7 eine Draufsicht auf eine weitere Ausführungsform des Deckglasses mit dem Randspiegel,

5 Fig. 8 eine Draufsicht auf eine weitere Ausführungsform des Deckglasses mit dem Randspiegel; und

Fig. 9 eine Draufsicht auf eine rechteckige Ausführungsform des Deckglasses mit dem kreisförmigen Randspiegeln.

Fig. 1 zeigt ein Interferenzmikroskop, das als 4Pi-Mikroskop 1 ausgeführt ist. Eine Lichtquelle 10 definiert einen Lichtstrahl 9, der eine 10 Anregungslochblende 11 passiert und wird von einem dichroitischen Strahlteiler 12 in Richtung Strahlablenkvorrichtung 13 abgelenkt. Die Strahlablenkvorrichtung 13 scannt bzw. lenkt den Lichtstrahl 9a in zwei im Wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen ab, so dass letztendlich der Beleuchtungsfokus im Objektbereich durch die 15 Scanbewegung der Strahlablenkvorrichtung 13 beispielsweise meanderförmig einen zweidimensionalen Bereich der Fokalebene abscannt bzw. abrastert. Das in Fig. 1 lediglich schematisch dargestellte Interferenzmodul 14 ist in Fig. 2 gezeigt. Hierbei ist mit 8 die Schnittstelle zum Mikroskop angedeutet, die gleichzeitig eine korrespondierende Ebene zur Eintrittspupillenebene des 20 Objektivs des Interferenzmoduls 14 darstellt. Mit den durchgezogenen Linien, die mit 3, 3a und 3b bezeichnet sind, sind die vom Objekt 4 kommenden Lichtstrahlen angedeutet. Mit den gestrichelt eingezeichneten Linien, die mit 5, 5a und 5b bezeichnet sind, sind die auf das Objekt 4 gesendeten Lichtstrahlen angedeutet. Der Lichtstrahl 5 trifft auf eine Strahlablenkvorrichtung 13. Das 25 vom Objekt 4 reflektierte bzw. emittierte Fluoreszenzlicht 9b, gelangt vom Interferenzmodul 14 zur der Strahlablenkvorrichtung 13. Das Fluoreszenzlicht 9b passiert den Strahlteiler 12 und die Detektionslochblende 15. Hinter der Detektionslochblende 15 ist eine Detektoranordnung 16 vorgesehen. In dem hier offenbarten Ausführungsbeispiel besteht die Detektoranordnung 16 aus 30 einem ersten, einem zweiten, und einem dritten Detektor 16a, 16b und 16c. Der die Detektionslochblende 15 passierende Detektionslichtstrahl wird durch dichroitische Strahlteiler 17a und 17b auf die entsprechenden Detektoren

gelenkt. Es ist für einen Fachmann selbstverständlich, dass die Detektoranordnung auch andere Ausführungsformen annehmen kann. Ferner ist die hier offenbare Zahl der Detektoren und die Zahl der Strahlteiler in keiner Weise als eine Beschränkung aufzufassen. Im Interferenzmodul 14 ist

5 ein Spiegel 6 vorgesehen, der den auf das Objekt 4 gesendeten Lichtstrahl 5 umlenkt und auf einen Strahlteiler 7 richtet. Der Strahlteiler 7 teilt den auf das Objekt 4 gesendeten Lichtstrahl 5 in einen ersten und zweiten Lichtstrahl 5a und 5b auf. Vom Objekt 4 geht ein erster und ein zweiter Lichtstrahl 3a und 3b aus. Ferner ist in den vom Objekt 4 ausgehenden ersten und

10 zweiten Lichtstrahlen 3a und 3b bzw. in den auf das Objekt 4 gesendeten Lichtstrahlen 5a und 5b jeweils ein Spiegel 18 zum Umlenken der Lichtstrahlen auf das Objekt 4 bzw. auf den Strahlteiler 7 vorgesehen. Auf beiden Seiten des Objekts 4 ist jeweils ein Objektiv 20 vorgesehen, die gegeneinander gerichtet sind. Lediglich schematisch sind die Eintrittspupillen

15 21 der Objektive 20 eingezeichnet. Ferner ist in dem ersten und zweiten Lichtstrahl 3a, 5a, 3b und 5b jeweils eine Linse 19 vorgesehen, die zur Pupillenverlagerung der Eintrittspupillen 21 dienen. Die Strahlablenkvorrichtung 13 (siehe Fig. 1) ist derart ausgestaltet, dass die auf das Objekt 4 gesendeten Lichtstrahlen 5a und 5b in einer durch die Objektive

20 20 festgelegten Objektebene 22 eine Scannbewegung ausführen. In dem hier konkret vorliegenden Fall durchläuft das vom Objekt 4 emittierte Fluoreszenzlicht 3a und 3b die Objektive 20. Das vom Objekt 4 reflektierte bzw. emittierte Fluoreszenzlicht 3a und 3b wird von den Objektiven 20 aufgesammelt und läuft in umgekehrter Richtung zu den auf das Objekt

25 gesendeten Lichtstrahlen 5a und 5b. So wird das reflektierte bzw. emittierte Fluoreszenzlicht 3a und 3b schließlich am Strahlteiler 7 vereinigt und nach der Reflexion am Spiegel 6 in Richtung der Schnittstelle 8 zum Mikroskop reflektiert. Lediglich Fluoreszenzlicht aus dem Fokusbereich der beiden Objektive 20 kann aufgrund der konfokalen Anordnung die

30 Detektionslochblende 15 passieren. Die der Detektionslochblende 15 nachgeordneten dichroitischen Strahlteiler 17a und 17b führen das Fluoreszenzlicht der unterschiedlichen Fluorochrome, mit denen das Objekt spezifisch markiert ist, den drei Detektoren 16a, 16b und 16c zu, die jeweils

Fluoreszenzlicht eines bestimmten Emissionswellenlängenbereichs detektieren. Es liegt im handwerklichen Können eines Fachmanns auch andere Detektoranordnungen zu wählen.

Fig. 3 zeigt eine Seitenansicht eines Probenträgers 30 für die konfokale

5 Floureszenzmikroskopie. Der Probenträger 30 besteht aus einem ersten und einem zweiten Deckglas 32 und 33. Auf dem zweiten Deckglas 33 ist ein Randspiegel 29 derart aufgebracht, dass dieser den Probenbereich 34 umschließt. In vorteilhafter Weise ist der Probenbereich 34 in der Mitte des zweiten Deckglases angeordnet. Dabei handelt es sich in der Regel um

10 kreisförmige Deckgläser 32 und 33. Ebenso ist es denkbar, dass ein ringförmiger Randspiegel 29 auf einem rechteckigen Deckglas 32 oder 33 aufgebracht ist. Hinzu kommt, dass auch Deckgläser in der Form eines Polygons mit gleich langen Seiten verwendet werden können. In diesem Probenbereich 34 können aufgebrachte Objekte 4, orthogonal zur

15 Objektebene 22, von beiden Seiten in einer Fokalebene eines konfokalen Mikroskops betrachtet werden. Am Randspiegel 29 könnten zu Justagezwecken des interferometrischen Aufbaus Interferenzmessungen durchgeführt werden, um zum Beispiel die Wellenfronten der beiden Lichtstrahlen 5a und 5b, die jeweils von einer der sich gegenüberliegenden

20 Seiten des Randspiegels 29 reflektiert werden, abzugleichen. Die Phasenbeziehungen können zueinander verglichen und aufeinander abgestimmt werden. Mit Hilfe des Randspiegels 29 können auch die optischen Weglängen der beiden Interferometerarme des 4Pi-Aufbaus aufeinander angepasst werden. Üblicherweise wird dazu ein Kurzpuls laser oder eine

25 kurzkohärente Lichtquelle, wie etwa eine Halogenlampe, verwendet. Der Aufbau des Probenträgers 30 besteht aus einem ersten Deckglas 32, wobei das Substrat des Deckglases 32 aus allen anisotropen oder isotropen klaren Materialien bestehen kann. Zusätzlich zum ersten Deckglas 32 ist ein zweites Deckglas 33 vorgesehen, dessen Substrat aus allen anisotropen oder

30 isotropen klaren Materialien bestehen kann; auf dem zweiten Deckglas 33 ist zusätzlich der Randspiegel 29 aufgebracht. Das Material des Randspiegels 29 kann aus allen Materialen bestehen, die zur Reflektion von Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen  $\lambda = 300\text{nm} - 1300\text{nm}$  geeignet sind.

Beispielsweise kann der Randspiegel 29 aus einer Aluminium- oder Silberschicht mit Schutzschicht oder aus einer einfachen Goldschicht bestehen. Denkbar ist auch eine dielektrische Verspiegelung. Dabei reicht es in speziellen Fällen aus, wenn der Spiegel in einem bestimmten Teilbereich 5 des Spektrums reflektierend wirkt. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel befindet sich der Randspiegel 29 kreisförmig um den eigentlichen Probenbereich 34 herum. Es ist auch jede andere Form möglich, solange der Randspiegel den Probenbereich umschließt. Denkbar wäre also auch eine rechteckige Form mit einem rechteckigen oder runden Loch in der Mitte. Das 10 hat den Vorteil, dass beim Verfahren des Probenträgers 30 senkrecht zur optischen Achse 25 (definiert durch die Objektive 20, die beiderseits des Probenträgers 30 angeordnet sind) aus dem Probenbereich 34 heraus zu irgendeinem Randbereich hin, die optische Achse 25 immer eine verspiegelte Zone trifft. Das ist zum Abgleich der Justage sehr wichtig und nützlich. 15 Genauso wird nach dem Justagevorgang der Probenbereich 34 in eindeutiger Weise schnell wieder gefunden und die eigentliche Messung kann fortgesetzt werden. Die Zusammenstellung des Probenträgers 30 kann wie folgt beschrieben werden. Zunächst wird eine wässrige Probe (ca. 1 µl) auf den Probenbereich 34, der sich im Normalfall in der Mitte des zweiten Deckglases 20 befindet, aufgebracht. Da es sich um eine wässrige Probe handelt, bildet diese einen Tropfen und benetzt nicht die Verspiegelung. Zusätzlich zur eigentlichen Probe können der wässrigen Lösung Qualitätsstandard-Beads (z.B. mit einer Größe von 100nm) zugeführt werden. Diese dienen ebenfalls Justagezwecken. Dabei kann dann an Hand der Abbildung der 25 Qualitätsstandard-Beads überprüft werden, wie gut die Auflösung in den drei Raumrichtungen ist. Die Probe wird anschließend mittels eines Trocknungsverfahrens behandelt. Das Wasser verdunstet und eine eigentliche Probe 37 bleibt am zweiten Deckglas 33 des Probenträgers 30 kleben. Zur Verstärkung der Haftung dienen geeignete Proteine, wie beispielsweise Poly- 30 L-Lysin, die sich ebenfalls in der wässrigen Probenlösung befunden haben. Danach wird eine definierte Menge eines Füllmaterials (z.B. 1 µl) auf den Probenbereich 34 aufgebracht und das erste und das zweite Deckglas 32 und 33 werden anschließend geeignet übereinander gebracht und fest miteinander

verbunden. Dazu wird diese Sandwichstruktur, bestehend aus dem ersten Deckglas 32, der eigentlichen Probe 37 mit dem Füllmaterial und dem zweiten Deckglas 33 in einen Rahmen 35 gelegt und mit einem Spezialkleber 36.

fixiert. Dazu kann es ausreichen mit dem Spezialkleber 36 nur eines der

- 5 Deckgläser 32 oder 33 am Rahmen zu fixieren. Als Spezialkleber können z.B. Paraffin, Wachs, diverse Lacke, Kunststofffüller, wie Silicone Verwendung finden. Beim Zusammenstellen der Sandwichstruktur verteilt sich das Füllmaterial gleichmäßig auf der eigentlichen Probe 37 und füllt einen Zwischenraum 38 gleichmäßig, der zwischen dem ersten und dem zweiten
- 10 Deckglas 32 und 33 gebildet ist. Durch das im Zwischenraum 38 gleichmäßig verteilte Füllmaterial erreicht man, dass überall nahezu der gleiche Brechungsindex vorhanden ist. Bei der Verwendung von Quarzdeckgläsern ist Glyzerin ein geeignetes Füllmaterial. Andere Kombinationen, wie beispielsweise BK7-Glas und Immersions-Mikroskopie-Öl sind ebenfalls
- 15 denkbar. Wichtig ist nur, dass im gesamten Raum zwischen den Objektiven 20 nur wenig Brechungsindexschwankungen vorhanden sind. Es hat sich herausgestellt, dass für eine 4Pi-Anwendung der Zwischenraum 38 nicht dicker als 50 µm sein sollte. Wie bereits in Fig. 2 beschrieben ist jeweils an beiden Seiten des Probenträgers 30 ein Objektiv 20 angeordnet, das jeweils
- 20 über ein Immersionsmedium 31 an den Probenträger 30 optisch gekoppelt ist.

Fig. 4a zeigt eine Draufsicht auf ein kreisförmiges Deckglas 40, das zumindest aus einem transparenten Material aufgebaut ist. In der Fig. 4b ist das Deckglas 40 aus Fig. 4a in der Seitenansicht dargestellt. Das Deckglas 40 besitzt eine Oberseite 41 und eine Unterseite 42, die mit keinem zusätzlichen

- 25 Mittel oder Aufdruck versehen ist.

Fig. 5a zeigt eine Draufsicht auf ein kreisförmiges Deckglas 50 mit einem Randspiegel 29. Der Randspiegel 29 ist so aufgebracht, dass dieser den Probenbereich 34 umschließt, auf den die zu untersuchende Probe

- 30 aufgebracht wird. Die Seitenansicht des Deckglases 50 ist in Fig. 5b dargestellt. Das Deckglas besitzt eine Oberseite 51 und eine Unterseite 52. Auf der Oberseite 51 ist der Randspiegel 29 aufgebracht.

Fig. 6 zeigt eine Draufsicht auf eine Ausführungsform eines Deckglases 60 mit dem Randspiegel 29 auf der Oberseite 61 des Deckglases 60. Das Deckglas 60 hat die Form eines gleichseitigen Dreiecks. Es ist selbstverständlich, dass das Deckglas ohne Randspiegel die gleiche Form hat wie das Deckglas 60 mit dem Randspiegel 29.

Fig. 7 zeigt eine Draufsicht auf eine Ausführungsform eines Deckglases 70 mit dem Randspiegel 29 auf der Oberseite 71 des Deckglases 70. Das Deckglas 70 hat die Form eines Quadrats.

Fig. 8 zeigt eine Draufsicht auf eine Ausführungsform eines Deckglases 80 mit dem Randspiegel 29 auf der Oberseite 81 des Deckglases 80. Das Deckglas 80 hat die Form eines sechsseitigen Polygons. Alle Seiten des Polygons sind gleich lang.

Fig. 9 zeigt eine Draufsicht auf eine Ausführungsform eines Deckglases 90, auf der zwei Randspiegel 29 auf der Oberseite 91 des Deckglases 90 vorgesehen sind. Das Deckglas 90 hat eine rechteckige Form. Bei dieser Ausführungsform ist es dem Benutzer möglich zwei Proben zu präparieren und zu untersuchen.

Der hier offenbare Probenträger 30 ist insbesondere für interferometrische Verfahren in der konfokalen Fluoreszenz- Mikroskopie geeignet und wird dort eingesetzt. Diese Verfahren sind z.B. die 4Pi-, Wellenfeld-,  $I^2M$ -,  $I^3M$ - und  $I^5M$ - sowie die Theta-Mikroskopie.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste

1 4Pi-Mikroskop

3 vom Objekt kommender Lichtstrahl

5 3a erster Lichtstrahl

3b zweiter Lichtstrahl

4 Objekt

5 auf das Objekt gesendeter Lichtstrahl

5a erster Lichtstrahl

10 5b zweiter Lichtstrahl

6 Spiegel

7 Strahlteiler

8 Schnittstelle zum Mikroskop

9 Lichtstrahl

15 9a Lichtstrahl

9b Fluoreszenzlicht

10 Lichtquelle

11 Anregungslochblende

12 Strahlteiler

20 13 Strahlablenkvorrichtung

14 Interferenzmodul

15 Detektionslochblende

16 Detektoranordnung

16a erster Detektor

25 16b zweiter Detektor

16c dritter Detektor  
17a dichroitischer Strahlteiler  
17b dichroitischer Strahlteiler  
18 Spiegel  
5 19 Linse  
20 Objektiv  
21 Eintrittspupille  
22 Objektebene  
25 optische Achse  
10 29 Randspiegel  
30 Probenträger  
31 Immersionsöl  
32 erstes Deckglas  
33 zweites Deckglas  
15 34 Probenbereich  
35 Rahmen  
36 Spezialkleber  
37 eigentliche Probe  
38 Zwischenraum  
20 40 kreisförmiges Deckglas  
41 Oberseite  
42 Unterseite  
50 Deckglas  
51 Oberseite  
25 52 Unterseite

- 60 Deckglas
- 61 Oberseite
- 70 Deckglas
- 71 Oberseite
- 5 80 Deckglas
- 81 Oberseite
- 90 Deckglas
- 91 Oberseite

**Patentansprüche**

1. Probenträger (30) für die Mikroskopie, insbesondere der konfokalen Mikroskopie, aus einem ersten Deckglas (32) und einem zweiten Deckglas (33), dadurch gekennzeichnet, dass das zweite Deckglas (33) einen Randspiegel (29) trägt, der Randspiegel (29) derart ausgestattet ist, dass er einen Probenbereich (34) umschließt, dass ein Rahmen (35) vorgesehen ist, der das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) hält, und dass zwischen diesen ein Zwischenraum (38) ausgebildet ist, und dass der Zwischenraum (38) mit einem Medium gefüllt ist, das in etwa den gleichen Brechungsindex wie das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) aufweist.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat des ersten und des zweiten Deckglases (32 und 33) aus anisotropen oder isotropen und für die verwendeten Wellenlängen transparenten Materialien besteht.
3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) aus Quarzglas bestehen, und dass das Medium im Zwischenraum (38) Glyzerin ist.
4. Probenträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand zwischen dem ersten und dem zweiten Deckglas (32 und 33) nicht größer als 50µm ist.
5. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Randspiegels (29) aus einem Material besteht, das für Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen  $\lambda = 300\text{nm} - 1300\text{nm}$  reflektierend wirkt.
6. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Material des Randspiegels (29) Aluminium oder Silber mit einer Schutzschicht oder Gold ist.
7. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das der Randspiegels (29) aus einer dielektrisch Verspiegelung besteht.

8. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Randspiegel (29) als kreisförmiger Ring um den Probenbereich (34) herum ausgebildet ist.
9. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass 5 mindestens das erste oder das zweite Deckglas (32 oder 33) am Rahmen (35) mit einem Spezialkleber (36) fixiert ist.
10. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) die Form eines Kreises aufweisen.
11. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das 10 erste und das zweite Deckglas (32 und 33) die Form eines Polygons mit gleich langen Seiten besitzt.
12. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) die Form eines Rechtecks aufweisen.
13. Verwendung des Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 12, 15 dadurch gekennzeichnet, dass dieser bei interferometrischen Verfahren in der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt wird, wie die 4Pi-, Wellenfeld-,  $I^2M$ -,  $I^3M$ - und  $I^5M$ - sowie die Theta-Mikroskopie.
14. Verfahren zum Anfertigen eines Probenträgers (30), insbesondere für 20 die konfokale Mikroskopie, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - Aufbringen einer wässrigen Lösung, die eine Probe (37) enthält, auf einen Probenbereich (34) eines zweiten Deckglases (33) des Probenträgers (30);
  - Trocknen des zweiten Deckglases (33) derart, dass das Wasser verdunstet und die Probe (37) am Probenbereich (34) des zweiten Deckglases (33) des Probenträgers (30) haften bleibt;
  - Aufbringen eines Mediums auf den Probenbereich (34), das im Wesentlichen dem Brechungsindex des verwendeten Deckglases (33) entspricht;

- Zusammenfügen eines ersten Deckglases (32) und des zweiten Deckglases (33) derart, dass sich die Probe in einem durch das erste und das zweite Deckglas gebildeten Zwischenraum befindet; und
- Einbringen des zusammengefügten ersten und zweiten Deckglases (32 und 33) in einen Rahmen (35).

5

- 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens das erste oder das zweite Deckglas (32 oder 33) am Rahmen (35) mit einem Spezialkleber (36) fixiert werden.
- 16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der

10

- Probenbereich (34) durch einen Randspiegel (29) definiert wird, wobei der Randspiegel (29) den Probenbereich (34) umschließt.
- 17. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung als Tropfen auf den Probenbereich (34) derart aufgebracht wird, dass der Randspiegel (29) nicht benetzt wird.

15

- 18. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium, das einen zu den Deckgläsern (32, 33) vergleichbaren Brechungsindex aufweist, auf die von Wasser befreite Probe aufgebracht wird.
- 19. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass an gegenüberliegenden Seiten des Probenträgers (30) jeweils ein Objektiv (20)

20

- derart angeordnet wird, dass dessen optische Achse (25) durch den Probenbereich (34) verläuft, und dass jedes Objektiv (20) über ein Immersionsmedium (31) an das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) des den Probenträger (30) optisch gekoppelt wird.
- 20. Verwendung des Probenträgers (30), der gemäß einem Verfahren

25

- nach den Ansprüchen 14 bis 19 hergestellt wird, in der konfokalen Fluoreszenz- Mikroskopie, wie die 4Pi-, Wellenfeld-,  $I^2M$ -,  $I^3M$ - und  $I^5M$ - sowie die Theta-Mikroskopie.
- 21. Verwendung des Probenträger (30) der gemäß einem Verfahren nach den Ansprüchen 14 bis 19 hergestellt wird, für Justagezwecke, Abgleich der

30

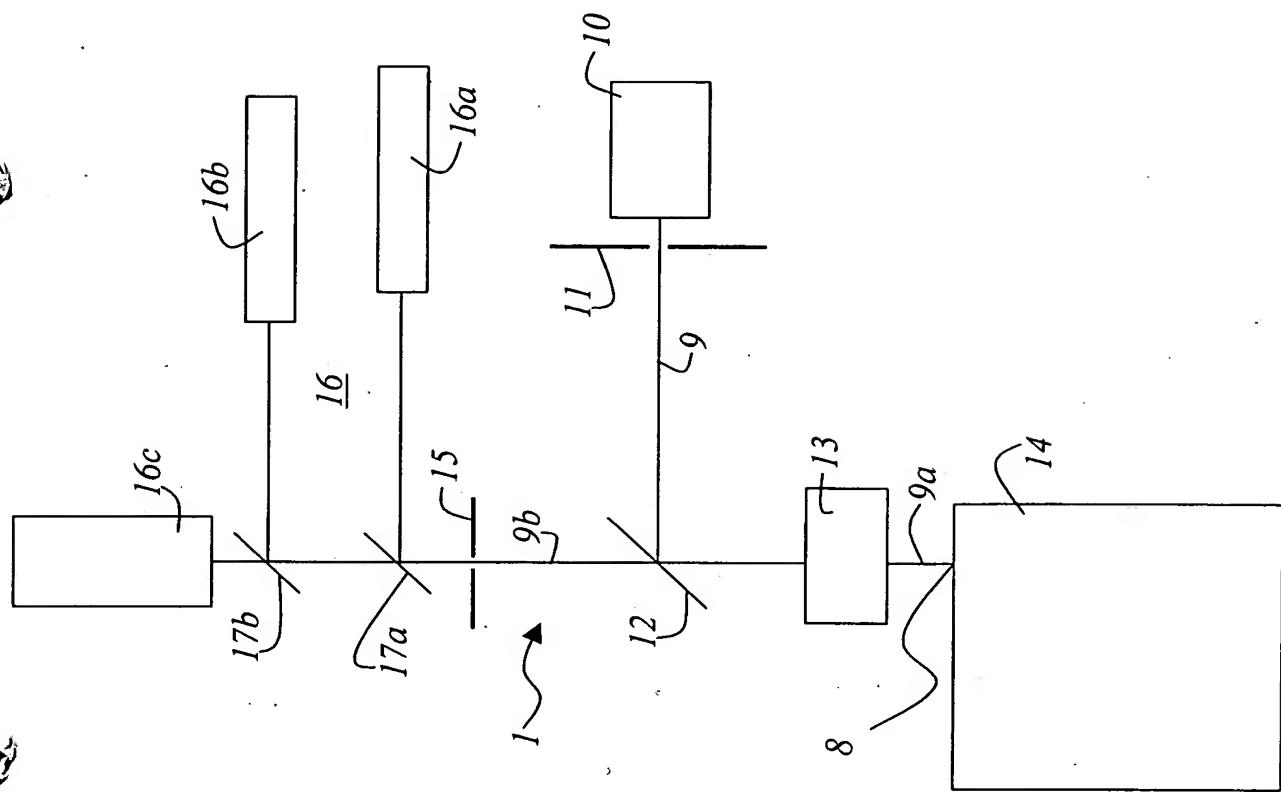
- Wellenfronten, Phasenabgleich, Weglängenabgleich und einfachen und

schnellen Wechsel zwischen dem Randspiegel (29) und dem Probenbereich (34).

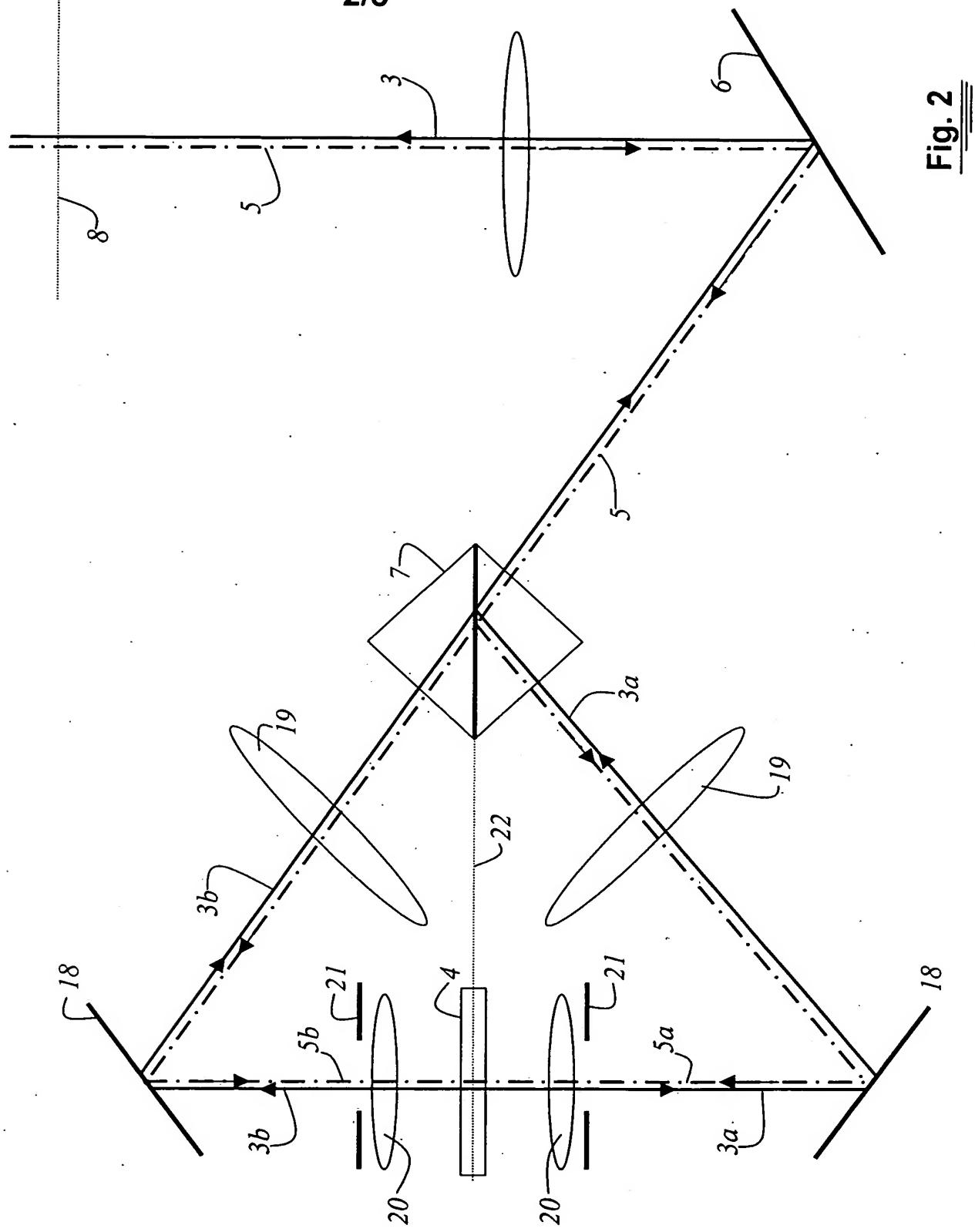
Zusammenfassung

Es ist ein Probenträger (30) für die Mikroskopie, insbesondere der konfokalen Mikroskopie, und ein Verfahren zur Herstellung des Probenträgers (30) offenbart. Der Probenträger (30) besteht aus einem ersten Deckglas (32) und einem zweiten Deckglas (33). Dabei trägt das zweite Deckglas (33) einen Randspiegel (29), der derart ausgestattet ist, dass er einen Probenbereich (34) umschließt. Ferner ist ein Rahmen (35) vorgesehen, der das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) hält. Die in dem Rahmen (35) befindlichen Deckgläser bilden einen Zwischenraum (38) aus, wobei dieser Zwischenraum (38) mit einem Medium gefüllt ist, das in etwa den gleichen Brechungsindex wie das erste und das zweite Deckglas (32 und 33) aufweist.

15 Fig. 3

Fig. 1

2/5



3/5

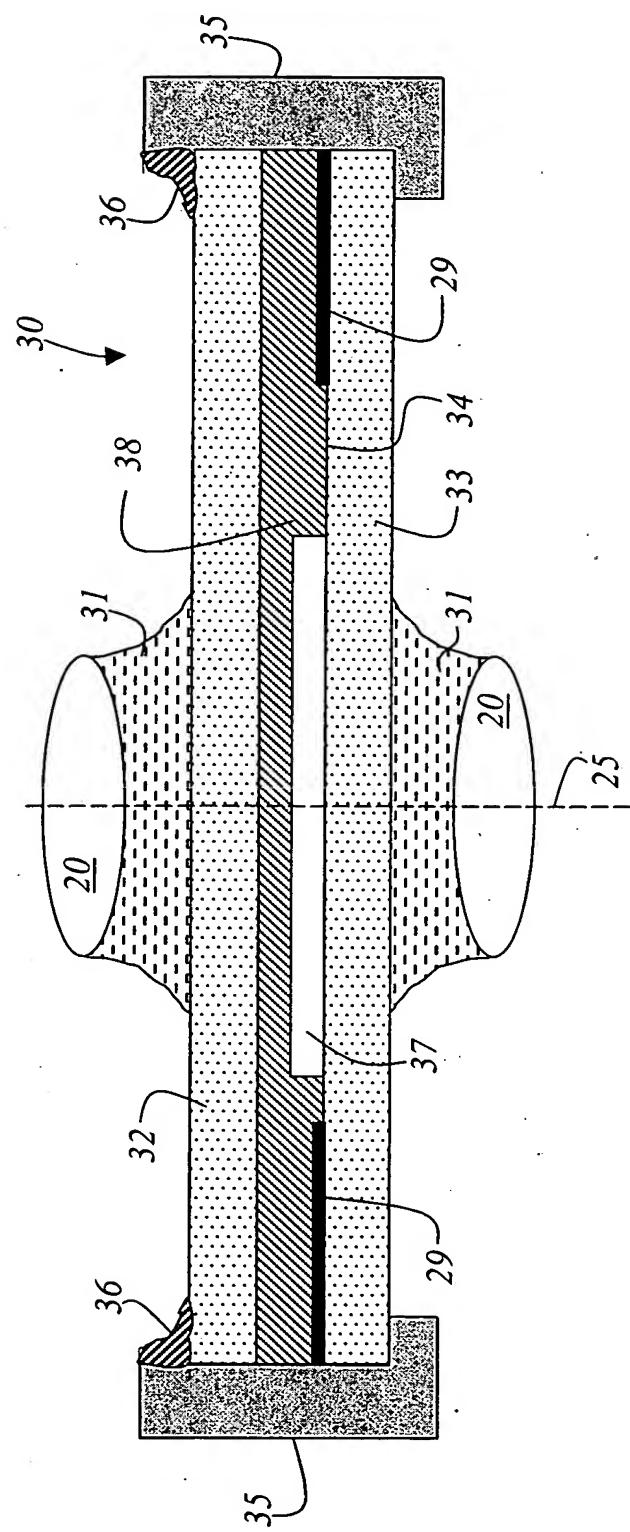


Fig. 3

4/5

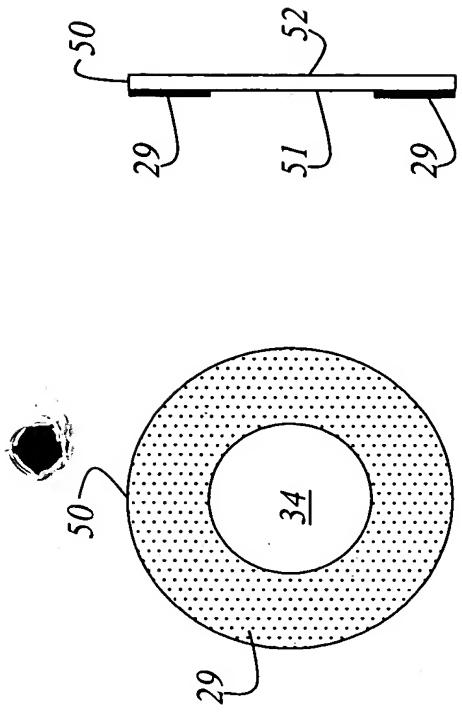


Fig. 5b

Fig. 5a

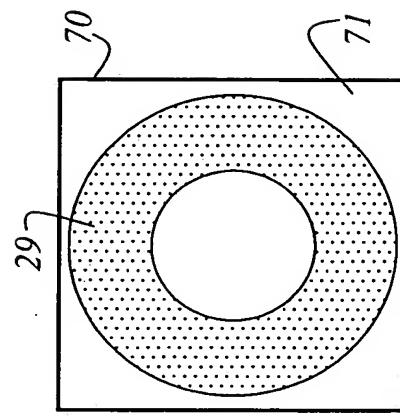


Fig. 7

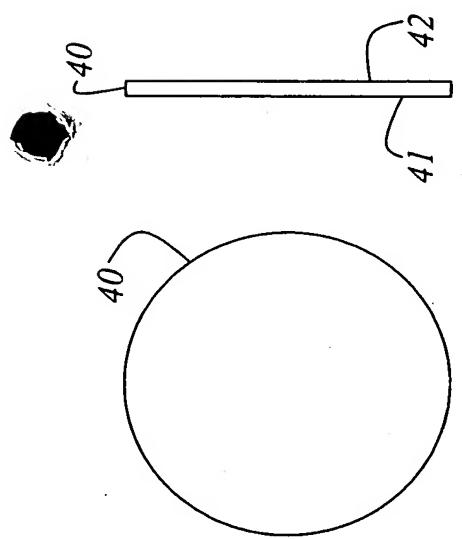
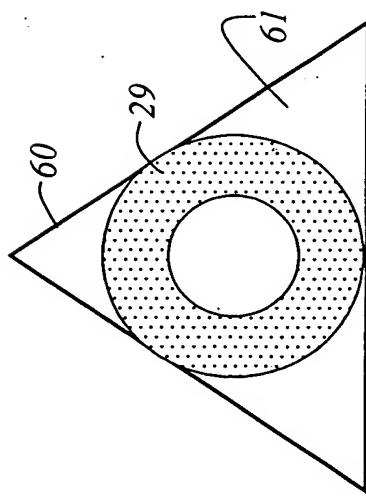


Fig. 5a



5/5

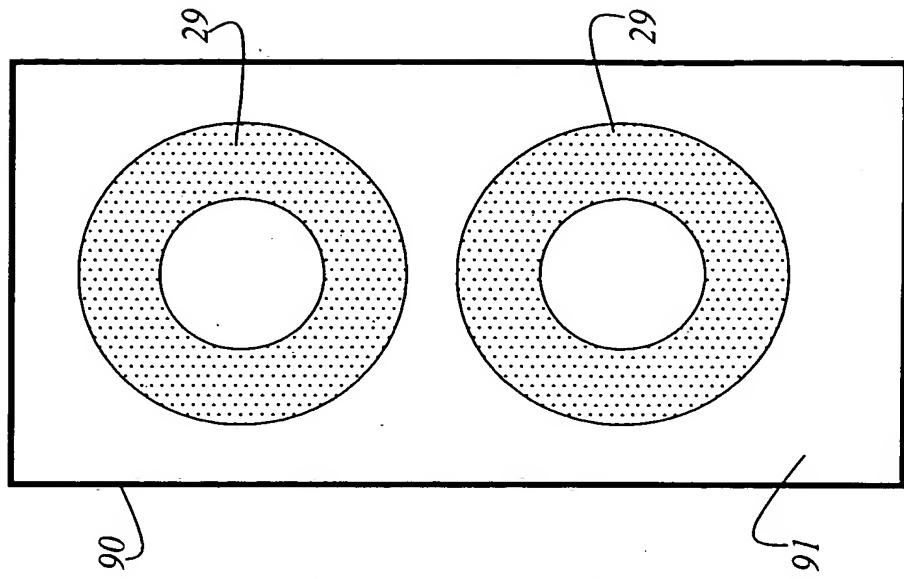


Fig. 9

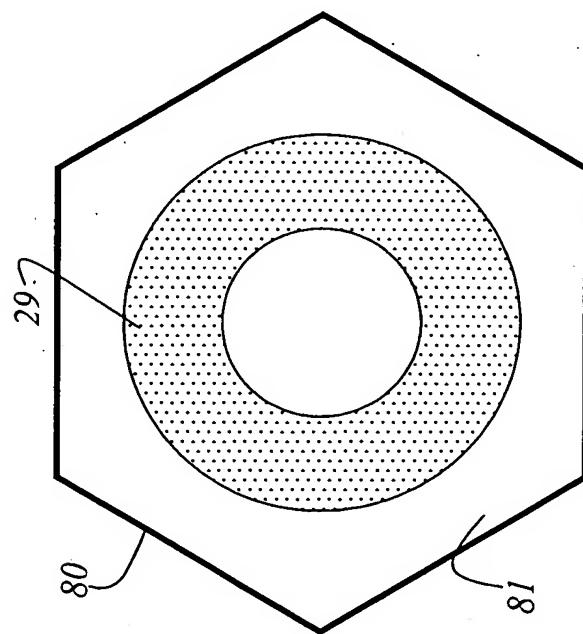


Fig. 8